

Prozess zur Kultivierung von Mikroorganismen der Gattung
Thraustochytriales.

Verschiedene mehrfach-ungesättigte Fettsäuren (PUFAs für polyunsaturated fatty acids) und insbesondere omega-3 Fettsäuren (n3-Fettsäuren) sind essentielle Bestandteile der menschlichen Ernährung.

Allerdings ist bekannt, dass in den meisten Industrienationen die Versorgung mit n3-Fettsäuren mangelhaft ist. Dagegen ist der Gesamtfettanteil in der Ernährung, sowie die Zufuhr an gesättigten Fettsäuren und n6-Fettsäuren zu hoch. Dies beruht auf einer Veränderung unserer Nahrungszusammensetzung, die vor allem in den letzten ca. 150 Jahren stattgefunden hat und die mit dem Auftreten verschiedener chronischer Zivilisationskrankheiten, wie beispielsweise Herz-Kreislaufkrankungen - der Haupttodesursache in Industrienationen - korreliert wird (Simopoulos, A.P., 1999, *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 560-569). Eine Vielzahl von Studien hat inzwischen gezeigt, dass durch die gezielte Erhöhung der Zufuhr von n3-Fettsäuren, insbesondere von Eicosapentaensäure (EPA) und von Docosahexaensäure (DHA), das Herz-Kreislauf-Risiko signifikant reduziert werden kann (GISSI-Prevenzione Investigators (Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico), 1999, Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-prevenzione trial., *Lancet* 354, 447-455; Burr *et al.*, 1989, Effects of changes in fat, fish, and fibre intake on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 2, 757-761). Dementsprechend wird von vielen verschiedenen Organisationen (WHO, FAO, AHA; ISSFAL, British Nutrition Foundation u.v.a.) empfohlen, die Zufuhr von n3-Fettsäuren signifikant zu erhöhen (Kris-Eherton *et al.*, Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Circulation* 2002, 2747-2757).

Quellen für die Gewinnung von PUFAs und insbesondere n3-Fettsäuren sind vor allem marine Kaltwasserfische und daraus gewonnene Öle, aber auch marine Mikroorganismen, welche gegenüber Fischen den Vorteil haben, dass sie in Fermentern unter kostengünstigen und kontrollierten Bedingungen zur Produktion von PUFAs herangezogen werden können. Bei einer fermentativen Herstellung besteht keine Gefahr der Verunreinigungen, wie sie für Fische oder daraus gewonnene Fischöle oft beschrieben werden (Olsen SF. *Int J Epidemiol.* 2001: 1279-80). Außerdem lässt sich die Zusammensetzung der gewonnenen Öle durch Auswahl des Organismus und der Kulturbedingungen positiv beeinflussen und ist nicht

saisonalen Schwankungen unterworfen, wie dies ebenfalls für Fisch und Fischprodukte beschrieben ist (Gamez-Meza et al. Lipids 1999:639-42).

Mikroorganismen, welche sich zur Gewinnung von n3-PUFA eignen, finden sich beispielsweise bei den Bakterien unter der Gattung *Vibrio* (z. B.: *Vibrio marinus*) oder unter den Dinoflagellaten (*Dinophyta*), dort insbesondere die Gattung *Crypthecodinium*, wie *C. cohnii* oder unter den Stramenopiles, wie die *Pinguiophyceae* wie z.B. *Glossomastix*, *Phaeomonas*, *Pinguiochrysis*, *Pinguiococcus* und *Polydochrysis*. Bevorzugte Mikroorganismen zur fermentativen Herstellung von PUFA gehören zu den Stramenopiles (oder *Labyrinthulomycota*), insbesondere zur Ordnung *Thraustochytriales*, (*Thraustochytriidea*) und dort wieder insbesondere zu den Gattungen *Japonochytrium*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Althornia*, *Labyrinthuloides*, *Aplanochytrium* und *Ulkenia*.

Es ist bekannt, dass einige der genannten Mikroorganismen zur industriellen Produktion von Fettsäuren verwendet werden können, entsprechende Verfahren wurden beschrieben. So offenbart die internationale Patentanmeldung WO 91/07498 A1 die Herstellung von PUFAs mit Organismen der Gattungen *Schizochytrium* und *Thraustochytrium*. WO 91/11918 A1 offenbart die Herstellung von PUFAs mit *Crypthecodinium cohnii*, WO 96/33263 A1 und die entsprechende europäische Patentanmeldung EP 0 823 475 A1 beschreiben die Herstellung von PUFAs mit Mikroorganismen der Gattung *Schizochytrium*, während die Patentanmeldung WO 98/03671 die Herstellung von PUFAs mit Mikroorganismen der Gattung *Ulkenia* offenbart.

Der natürliche Lebensraum der beschriebenen Mikroorganismen und insbesondere der *Labyrinthulomycota* sind marine Habitate. Herkömmlicherweise werden diese Mikroorganismen also in entsprechend salzhaltigen Medien kultiviert, wobei für die Zwecke der vorliegenden Erfindung der Salzgehalt von Meerwasser bei 32-35 g/l und einem Anteil von 90-95% an Natrium und Chlorid definiert wird. Typische Medien zur Kultivierung von marinen Mikroorganismen wie *Thraustochytrium* oder *Schizochytrium* basieren auf Seewasser (z.B. ATCC (American Type Culture Collection) 790 By+ Medium [Hefeextrakt 1.0 g, Peptone 1.0 g, D+-Glucose 5.0 g, Seewasser 1 L]). Es ist aber auch bekannt, dass Mikroorganismen der Ordnung *Thraustochytriales* bei sehr niedriger Salinität im Kulturmedium überleben können. Ihr Wachstum wird jedoch unterhalb einer Grenze von 7,5 – 15 g Salz/L, entsprechend einer Salinität von 7,5 - 15‰, als nur sehr gering und ohne

Zwischenmaxima im niedrigen Salinitätsbereich beschrieben. Optimale Wachstumsraten werden nur oberhalb der oben angegebenen Salinitätsgrenze erzielt (Fan et al. Botanica Marina 45, 2002, S. 50-57).

Ein häufig auftretendes Problem fermentativer Prozesse sind starke pH-Schwankungen im Verlauf der Kultivierung als Folge des Auftretens von Stoffwechselprodukten und/oder des Verbrauchs von einzelnen Medienkomponenten. Dies gilt insbesondere für salzreiche Medien zur Fermentation mariner Mikroorganismen. Daher benötigen solche Fermentationen oft eine pH-Regulierung. Die Steuerung des pH-Wertes führt allerdings bei Fermentationen im Großmaßstab zu einem erheblichen Mehraufwand. Dabei werden zusätzliche Behältnisse für die Zugabe von Säuren und Laugen benötigt, die ansonsten anderweitig für die Zufütterung additiver Komponenten verwendet werden könnten. Weiterhin muß die Titration zur Regulierung des pH-Wertes technisch gesteuert werden. Im Zusammenhang mit der Fermentation von *Labyrinthulomycota* zur Gewinnung von PUFA im Produktionsmaßstab werden im Stand der Technik pH-Wert kontrollierte Kultivierungsmethoden eingesetzt.

Die Kontrolle des pH-Wertes über ansonsten in der Zellkultur übliche Puffersysteme weist jedoch Nachteile auf. So ist die Pufferkapazität von zum Beispiel TRIS, HEPES und MOPS aufgrund ihrer pK_a -Werte über 7, im für die PUFA-Fermentation notwendigen pH-Bereich nicht ausreichend. TRIS ist weiterhin ein schlechter Puffer in pH-Bereichen unter 7,5, ein potentiell reaktives primäres Amin und kann an den unterschiedlichsten biologischen Reaktionen aktiv teilnehmen. Phosphatpuffer, ein ebenfalls häufig eingesetzter Puffer, hat die Eigenschaft bei Gegenwart von divalenten Kationen aus der Lösung auszufallen und ist ferner eine schlechte Wahl bei fermentativen Prozessen, die Phosphat benötigen bzw. verbrauchen. Acetatpuffer sind aufgrund ihres engen Pufferbereichs und durch die Tatsache, dass sie im Verlauf der Fermentation metabolisiert werden, ungeeignet. Darüber hinaus sind viele alternative Puffersysteme infolge hoher Kosten unwirtschaftlich.

In Anbetracht des Standes der Technik war es daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein neues, einfaches und wirtschaftliches Kultivierungsverfahren für marine Mikroorganismen zur Verfügung zu stellen. Hierbei sollte eine starke Vereinfachung der Prozeßführung erreicht werden. Abgesehen von der Kosteneffizienz sollte das Verfahren die Herstellung hoch reiner PUFAs in hoher Ausbeute ermöglichen.

Gelöst werden diese sowie weitere, nicht explizit genannten Aufgaben, die jedoch aus den hierin einleitend diskutierten Zusammenhängen ohne weiteres ableitbar oder erschließbar sind, durch den Gegenstand, der in den Ansprüchen der vorliegenden Erfindung definiert ist.

Ein vorteilhaftes Verfahren für die Kultivierung von Mikroorganismen der Ordnung *Thraustochytriales* wird durch das in Anspruch 1 definierte Verfahren zur Verfügung gestellt. Dieses Verfahren umfasst die Kultivierung in einem ausschließlich durch CaCO_3 pH-Wert stabilisierten Medium, umfassend einen CaCO_3 -Gehalt von 3-15 g/L und gegebenenfalls die anschließende Isolation der PUFAs aus den Mikroorganismen und/oder dem Kulturmedium.

Die Erfindung umfasst weiterhin ein Verfahren zur Produktion hochreiner PUFAs.

Bevorzugte PUFAs sind erfindungsgemäß DHA, DPA und EPA.

Insbesondere zeigen die in dem oben genannten Verfahren kultivierten Mikroorganismen eine Produktion von mehr als 10%, bevorzugt mehr als 14%, und ganz besonders bevorzugt mehr als 18% DHA pro Biotrockenmasse

Insbesondere zeigen die in dem oben genannten Verfahren kultivierten Mikroorganismen eine Produktion von mehr als 1%, bevorzugt mehr als 2%, und ganz besonders bevorzugt mehr als 3% DPA pro Biotrockenmasse.

Durch an die Kultivierung anschließende Isolation der PUFAs aus den Mikroorganismen (Biomasse) und/oder dem Kulturmedium können die PUFAs in hoher Ausbeute und Reinheit gewonnen werden.

Weiterhin umfasst die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung von Biomasse, wobei die Biomasse durch das erfindungsgemäße Kultivierungsverfahren zur Verfügung gestellt wird.

Diese Biomasse kann auf alle erdenklichen Arten Verwendung finden. Insbesondere kann diese Biomasse, z.B. in getrocknetem Zustand (Biotrockenmasse), direkt als Nahrungsmittel oder als Futtermittel eingesetzt werden.

Weiterhin umfasst die Erfindung auch ein Öl, welches dadurch gewonnen wird, dass das erfindungsgemäße Kultivierungsverfahren durchgeführt wird, und das Öl aus den Mikroorganismen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.

Insbesondere handelt es sich dabei um ein Öl, welches neben vielen weiteren bevorzugten Verwendungszwecken mit Vorteil für die menschliche Ernährung verwendet werden kann.

Dabei zeigen die Mikroorganismen unter erfindungsgemäßen Bedingungen eine Produktion von mehr als 30 Gew.-% Öl, bevorzugt von mehr als 35 Gew.-% Öl pro Gewichtseinheit Biotrockenmasse.

Unter Öl wird erfindungsgemäß ein Anteil von mindestens 70 % Neutrallipiden und mindestens 2% Phospholipiden verstanden, was dem normalen, dem Fachmann bekannten Fettsäurespektrum der *Thraustochytriales* entspricht. Die Neutrallipide bestehen dabei aus mindestens 80% Triglyzeriden und anderen Verbindungen wie z.B Diacylglyzeride, Sterole usw. Weiterhin besteht der Gewichtsanteil der Triglyzeride aus etwa 95% Fettsäuren und 5% Glyzerin.

Die Möglichkeit einen marinen Mikroorganismus für die Produktion von PUFA ohne externe pH-Wert Regulierung fermentieren zu können, insbesondere unter Bedingungen, die ein rasches Wachstum unter hohem Glukoseverbrauch ermöglichen, war völlig überraschend. Gerade unter solchen Bedingungen kommt es bei der Fermentation von marinen Mikroorganismen ohne entsprechende pH-Kontrolle sehr schnell zu einer Ansäuerung des Mediums, die zum Einstellen des Wachstums führt (siehe Beispiel 1 und Wen, Z.-Y. and Chen, F., 2003, Biotechnology Advances 21, 273-294).

Das erfindungsgemäße Verfahren kommt überraschenderweise ohne den Zusatz sonstiger pH-Wert stabilisierender Mittel aus. Unter pH-Wert stabilisierenden Mitteln wird erfindungsgemäß sowohl der in Abhängigkeit von dem sich während der Kultur einstellenden pH-Wert geregelte Zusatz von Säure oder Base aus Zusatztanks als auch die Verwendung von Puffersystemen im Medium selbst verstanden, obwohl den Erfindern wirtschaftlich nutzbare Kultivierungsverfahren unter Verwendung von Puffersystemen wie beispielsweise TRIS oder Phosphat-Puffer nicht bekannt sind.

Erfindungsgemäß ist CaCO_3 das wesentliche Mittel zur pH-Wert Stabilisierung ist. Trotzdem kann es sein, dass unter bestimmten Bedingungen der Zusatz von Säure oder Base zur Kultur zur Einstellung eines pH-Wertes nötig sein kann. Ein solcher Zusatz ist von der Erfindung mitumfasst, solange CaCO_3 das wesentliche Mittel zur pH-Wert Stabilisierung bleibt. Fällt beispielsweise der pH-Wert während der Kultivierung aufgrund besonders schnellen Wachstums der Mikroorganismen unter einen bestimmten Zielwert, so kann dieser Zielwert kurzfristig durch Zugabe von Säure oder Base eingestellt werden, ohne dass dieser Zusatz das wesentliche Mittel zur pH-Wert Regulierung ist.

Die Begriffe pH-Wert Regulierung und pH-Wert Steuerung bzw. pH-Wert Stabilisierung werden erfindungsgemäß synonym verwendet.

Wesentliches Mittel bleibt CaCO_3 , wenn der Betrag der Differenz der pH-Werte, die mit oder ohne Zusatz von Säuren – jeweils mit dem erfindungsgemäßen Zusatz von CaCO_3 – gemessen werden können, kleiner gleich 1 ist, bevorzugt kleiner gleich 0,75, besonders bevorzugt kleiner gleich 0,5, ganz besonders bevorzugt kleiner gleich 0,2 und am meisten bevorzugt kleiner gleich 0,1 ist. Ein solcher Zusatz von Säuren und/oder Basen wird als erfindungsgemäß geringfügiger Zusatz von Säuren und/oder Basen verstanden, der von der Erfindung mitumfasst ist.

Bevorzugt sind Kultivierungssysteme, die gänzlich ohne Einsatz von Säure- und/oder Basezusatz auskommen.

Darüber hinaus sind viele alternative Puffersysteme gegenüber der Verwendung von Calciumcarbonat, infolge höherer Kosten, unwirtschaftlich.

Die hohe Wirksamkeit von Calciumcarbonat als Puffer für die Kultivierung von Mikroorganismen der Ordnung *Thraustochytriales* ist überraschend, da entstehendes Kohlendioxid nur eine begrenzte Löslichkeit in Wasser besitzt und dadurch die Pufferkapazität während der Fermentation abnimmt.

Erstaunlicherweise war nicht nur die Fermentation bis zum vollständigen Verbrauch von Glukose möglich, es erhöhte sich darüber hinaus auch der Anteil der PUFA in der Biomasse signifikant bei Einsatz des erfindungsgemäßen Calciumcarbonat stabilisierten Mediums. Noch überraschender ist, dass die Glukoseverwertung und damit verbunden die PUFA-Produktion beschleunigt wird und so zu einer erhöhten Raum-Zeit-Ausbeute führt.

Bis zur vorliegenden Erfindung gab es keinen bekannten Fermentationsprozess zur Produktion von n3-Fettsäuren in Mikroorganismen aus der Ordnung *Thraustochytriales* unter Verwendung eines mit Calciumcarbonat pH-stabilisierten Mediums, wobei auf weitere pH-Wert stabilisierende Mittel verzichtet werden konnte.

PUFAs sind erfindungsgemäß mehrfach ungesättigte langkettige Fettsäuren mit einer Kettenlänge $>\text{C}_{12}$ mit mindestens zwei Doppelbindungen. Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren herstellbare PUFAs sind insbesondere n3-Fettsäuren und n6-Fettsäuren.

Unter n3-Fettsäuren (omega-3 Fettsäure, ω 3 Fettsäuren) im erfindungsgemäßen Sinn werden mehrfach ungesättigte langkettige Fettsäuren mit einer Kettenlänge $>C_{12}$ mit mindestens zwei oder mehr Doppelbindungen verstanden, wobei die erste der Doppelbindungen zwischen den Kohlenstoffatomen C3 und C4 ausgehend vom Alkylende konstituiert ist. Dementsprechend liegt bei n6-Fettsäuren die erste Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen C6 und C7 ausgehend vom Alkylende.

Für die Produktion der PUFAs nach dem erfindungsgemäßen Verfahren kommen Mikroorganismen aus der Gruppe der Labyrinthulomycota in Frage. Mikroorganismen der Ordnung *Thraustochytriales* (*Thraustchytriidea*) sind bevorzugt (Lewis, T.E., Nichols, P.D., McMeekin, T.A., The Biotechnological Potential of Thraustochytrids, Marine Biotechnology, 1999, S. 580-587 und Porter, D. Phylum Labyrinthulomycota in Handbook of protocista: the structure, cultivation, habitats, and life histories of the eukaryotic microorganisms and their descendants exclusive of animals, plants, and fungi: a guide to the algae, ciliates, foraminifera, sporozoa, water molds, and other protocists. Editors: Margulis, L, Corliss, J.O., Melkonian, M. and Chapman, D.J., editorial coordinator, McKhann, H.I., Jones and Bartlett Publishers, ISBN 0-86720-052-9 1990, S. 388-398). Besonders bevorzugt sind Mikroorganismen der Gattungen *Japonochytrium*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium*, *Althornia*, *Labyrinthuloides*, *Aplanochytrium* und *Ulkenia*. Ganz besonders bevorzugt sind hiervon *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* und *Ulkenia*. Insbesondere bevorzugt sind: *Japonochytrium* sp. ATCC 28207, *Thraustochytrium aureum* (insbesondere ATCC 28211 bzw. ATTC 34304), *Thraustochytrium roseum* ATCC 28210 *Thraustochytrium* sp. ATCC 20890, ATTC 20891, ATTC 20892 und ATTC 26185, *Schizochytrium aggregatum* ATTC 28209, *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 und ATTC 20889, *Schizochytrium* SR21, sowie *Ulkenia* spec. SAM 2179 und SAM 2180.

Für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete Mikroorganismen sind sowohl Wildtyp Formen als auch Mutanten und daraus abgeleitete Stämme sowie rekombinante Stämme der entsprechenden Organismen. In besonderem Maße umfasst die vorliegende Erfindung Mutanten oder rekombinante Stämme zur Produktionssteigerung von PUFA.

Die Mikroorganismen im Sinne der vorliegenden Erfindung werden durch Animpfen eines flüssigen oder eines festen Mediums mit einer Vorkultur dieser Organismen kultiviert.

Für Mikroorganismen der Ordnung *Thraustochytriales* geeignete Kulturtechniken sind dem Fachmann gut bekannt. Typischerweise, aber nicht ausschließlich, wird die Kultur mittels wässriger Fermentation in einem entsprechenden Behältnis durchgeführt. Beispiele für typische Behältnisse für eine derartige Fermentation umfassen Schüttelkolben oder Bioreaktoren, wie beispielsweise STRs (stirred tank reactors) oder Blasensäulen. Die Kultur wird typischerweise bei Temperaturen zwischen 10°C und 40°C durchgeführt, bevorzugterweise zwischen 20°C und 35 °C, besonders bevorzugt zwischen 25°C und 30°C, ganz besonders bevorzugt zwischen 27°C und 29°C und insbesondere bei 28 ±0,5°C.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung entspricht der Calciumcarbonatgehalt des pH-stabilisierten Mediums einem Wert im Bereich von 3g/L bis 15g/L, bevorzugt von 4g/L bis 12g/L und besonders bevorzugt von 5g/L bis 10g/L. Ganz besonders bevorzugt ist ein Calciumcarbonatgehalt von 7,5 ±0,5g/L.

Das pH-Wert stabilisierte Medium umfasst ferner bevorzugterweise eine oder mehrere Kohlenstoffquellen, sowie eine oder mehrere Stickstoffquellen. Dem Fachmann sind für die Kultivierung von Mikroorganismen der Ordnung *Thraustochytriales* als Kohlenstoff- und Stickstoffquellen verwendbare Substanzen gut bekannt.

Verwendbare Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Kohlenhydrate wie Glukose, Fruktose, Xylose, Saccharose, Maltose, lösliche Stärke, Fucose, Glucosamin, Dextran, Glutaminsäure, Melasse, Glyzerin oder Mannitol oder auch Fette und Öle oder pflanzliche Hydrolysate.

Einsetzbare natürliche Stickstoffquellen sind beispielsweise Pepton, Hefeextrakt, Malzextrakt, Fleischextrakt, Casamino-säuren, Maisquellwasser oder Sojabohnen, einsetzbare organische Stickstoffquellen sind beispielsweise Glutamat und Harnstoff, aber auch anorganische Stickstoffquellen wie zum Beispiel Ammoniumacetat, Ammoniumhydrogencarbonat, Ammoniumsulfat oder Ammoniumnitrat können als Stickstoffquelle verwendet werden.

Das pH-Wert stabilisierte Medium kann neben Calciumcarbonat alle weiteren dem Fachmann für die Kultivierung von Mikroorganismen der Ordnung *Thraustochytriales* förderlichen Bestandteile enthalten, insbesondere anorganische Salze von beispielsweise Ca, Mg, Na, K, Fe, Ni, Co, Cu, Mn, Mo oder Zn. Beispielhaft seien Phosphate wie Kaliumdihydrogenphosphat oder Chloride wie Magnesiumchlorid, Sulfate, wie Ammoniumsulfat, Magnesiumsulfat, Eisensulfat oder Natriumsulfat genannt. Weitere

verwendbare anorganische Salze sind beispielsweise Halogenide, wie Kaliumbromid oder Kaliumjodid und ebenso weitere Carbonate wie zum Beispiel Natriumhydrogencarbonat.

Ggf. kann das Medium zusätzliche Makro- oder Mikronährstoffe umfassen, wie Aminosäuren, Purine, Pyrimidine, Corn Steep Liquor (Maisquellwasser), Proteinhydrolysate, Vitamine (wasserlöslich und/oder wasserunlöslich) und andere dem Fachmann gut bekannte Medienbestandteile. Antischaummittel können zugegeben werden, falls notwendig. Das Medium kann komplexe Bestandteile enthalten oder chemisch definiert sein.

Die Menge der einzelnen Komponenten kann variieren, solange kein negativer Effekt auf das Wachstum oder die Produktivität der Mikroorganismen vorliegt. Der Fachmann kann die Zusammensetzung entsprechend den Bedürfnissen des Mikroorganismus im Einzelfall leicht ermitteln. Im Allgemeinen wird die Kohlenstoffquelle in einer Konzentration bis 300 g/l und die Stickstoffquelle in einer Konzentration von 1 bis 30 g/l zugegeben. Vorzugsweise wird der Stickstoffgehalt in Abhängigkeit vom Kohlenstoffgehalt des Mediums gestellt.

Ein besonders bevorzugtes pH-Wert stabilisiertes Medium umfasst Glukose, Hefeextrakt, Maisquellwasser (Corn Steep Liquor [CSL]), Magnesiumchlorid, Calciumcarbonat, Calciumchlorid, Natriumsulfat und Kaliumphosphat.

Der pH-Wert des Mediums wird vor Beginn der Fermentation auf einen Bereich von 3 bis 10, bevorzugt 4 bis 8, besonders bevorzugt 5 bis 7 und ganz besonders bevorzugt etwa 6 durch Zugabe einer entsprechenden Säure oder Lauge eingestellt.

Anschließend wird das Medium sterilisiert. Techniken zur Sterilisation von Medien sind dem Fachmann gut bekannt, beispielhaft seien Autoklavieren und Sterilfiltration genannt.

Die Kultivierung kann in Batch-, Fed-Batch- oder in kontinuierlicher Weise erfolgen, wie es dem Fachmann allgemein bekannt ist.

Eine Batch- oder Fed-Batch-Kultivierung erfolgt üblicherweise über 1 bis 12 Tage, bevorzugt 2-10 Tage, besonders bevorzugt für 3-9 Tage.

Die Medienbestandteile können dem Medium einzeln oder vermischt zugegeben werden, auch eine vorgefertigte Mischung ist denkbar. Die Bestandteile, insbesondere die Kohlenstoff- und Stickstoffquelle(n) oder bestimmte Mediumszusätze können vor oder

während der Kultivierung zugegeben werden. Die Zugabe kann einmal oder mehrmals wiederholt oder auch kontinuierlich erfolgen.

Die produzierten PUFA liegen im Allgemeinen in Form von Neutralfetten zum Beispiel als Triacylglyceride oder polare Lipide wie zum Beispiel Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylinositol vor.

Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung werden unter den Begriffen PUFA, n3-Fettsäure oder n3-Wirkstoffe alle möglichen Formen verstanden, in denen die entsprechenden Fettsäuren vorliegen können, d. h. sowohl als freie Fettsäuren, Ester, Triglyceride, Phospholipide oder andere Derivate. All diese Substanzen werden im Folgenden zusammengefasst und die Begriffe werden synonym verwendet. Im weiteren können die PUFAs durch chemische oder biokatalytische Umesterung beispielsweise mit Hilfe geeigneter Enzyme (Lipasen) umgesetzt und angereichert werden, vor oder nach der Isolierung aus der Kultur.

Die Isolierung von PUFAs aus den fermentierten Mikroorganismen bzw. dem Medium und die Analyse des Fettsäurespektrums erfolgt nach für den Fachmann bekannten und üblichen Verfahren (Wanasundara, U.N., Wanasundara, J., Shahidi, F., Omega-3 fatty acid concentrates: a review of production technologies, Seafoods – Quality, Technology and Nutraceutical Applications, 2002, S. 157-174).

Nachfolgend wird das dem erfindungsgemäßen Verfahren zugrunde liegende pH-stabilisierte Fermentationsmedium anhand einiger Beispiele beschrieben. Das Fermentationsmedium sowie die Erfindung sind jedoch nicht auf diese Beispiele beschränkt.

Beispiel 1: Fermentation von *Ulkenia* spec. Stamm SAM 2179 zur Produktion von PUFA in verschiedenen, ausschließlich durch unterschiedliche Mengen von CaCO_3 pH-Wert stabilisierten Kulturmedien.

Ulkenia spec. Stamm SAM 2179 wurde in 300ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane in 50mL Medium kultiviert.

Medienzusammensetzung:

Fermentationsmedium:

Glucose	150g/L
Maisquellwasser	3,75g/L
KH ₂ PO ₄	3g/L
Na ₂ SO ₄	1g/L
MgCl ₂ x6H ₂ O	1g/L
CaCl ₂ x2H ₂ O	0,3g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	5g/L

Zusatz CaCO₃ je 50mL Kolben: Medium 1.1 0g/L

Medium 1.2	1g/L
Medium 1.3	2g/L
Medium 1.4	5g/L
Medium 1.5	10g/L

pH-Wert mit NaOH auf 6,0 einstellen und autoklavieren

Kulturbedingungen:

Temperatur (°C): 28

Schüttelrate (rpm): 150

Zellernte erfolgte nach 96h Kultivierung durch Zentrifugation. Anschließend wurden die Zellen gefriergetrocknet und die Biotrockenmasse bestimmt. Aufschluß der Zellen und Bestimmung der Fettsäuren erfolgte durch Hitzebehandlung für 2 Stunden in 10%iger methanolischer Salzsäure bei 60°C (unter Rühren). Die Ester wurden dann im Gaschromatographen zur Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung analysiert.

Tabelle1: Fermentationsparameter in Abhängigkeit von der Calciumcarbonatkonzentration

	CaCO ₃ (g/L)	Glukose- verbrauch (g/L)	pH- Wert	BTM (g/L)	DHA- Area (%)	DHA/BTM (%)	DHA (g/L)	DHA-RZA (g/Lxd)
Medium 1.1	0	43,0	1,85	22,72	48,3	3,35	0,76	0,19
Medium 1.2	1	59,0	2,31	30,32	44,0	4,91	1,49	0,37
Medium 1.3	2	81,7	2,84	38,58	43,9	9,90	3,82	0,96
Medium 1.4	5	108,4	5,02	52,99	44,8	15,72	8,33	2,08
Medium 1.5	10	111,9	4,78	52,32	45,5	13,23	6,92	1,73

BTM: Biotrockenmasse; DHA/BTM: Gew.-% DHA (Docosahexaensäure) pro Gewichtseinheit BTM; g/lxd Raum-Zeit-Ausbeute in Gramm pro Liter pro Tag; RZA: Raum-Zeit-Ausbeute; DHA-Area (%) Anteil DHA im Fettsäurespektrum

Die Fermentation von *Ulkenia spec.* SAM 2179 in Fermentationsmedium ohne ausreichende pH-Stabilisierung führt im Verlauf der Fermentation zu einer Verlangsamung des Glukoseverbrauchs und zur Einstellung des Wachstums, infolge eines starken Absinkens des pH-Wertes (siehe Medium 1.1. – 1.3.). Erst größere Mengen von CaCO₃-Puffer führen zu einer Stabilisierung des pH-Wertes während der Kultur (Medium 1.4 und 1.5). Dabei kommt es mit zunehmender CaCO₃-Konzentration auch zu einem erhöhten Glukoseverbrauch während der Kultur. Infolge der pH-Wert Stabilisierung und dem damit zusammenhängenden erhöhten Glukoseverbrauch werden höhere Biomassewerte und daraus resultierend auch höhere DHA-Raum-Zeit-Ausbeuten, die unter den oben angegebenen Experimentalbedingungen bei etwa 2g/Lxd liegen, erzielt.

Beispiel 2: Fermentation von *Ulkenia spec.* Stamm SAM 2179 zur Produktion von PUFA in verschiedenen, ausschließlich durch unterschiedliche Mengen von CaCO₃ pH-Wert stabilisierten, Kulturmedien bis zur Glukoselimitierung.

Ulkenia spec. Stamm SAM 2179 wurde in 300ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane in 50mL Medium bis zum vollständigen Glukoseverbrauch kultiviert.

Medienzusammensetzung:

Fermentationsmedium:

Glucose	150g/L
Maisquell -wasser	3,75g/L
KH ₂ PO ₄	3g/L
Na ₂ SO ₄	1g/L
MgCl ₂ x6H ₂ O	1g/L
CaCl ₂ x2H ₂ O	0,3g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	5g/L

Zusatz CaCO₃ je 50mL Kolben: Medium 1.4 5g/L

Medium 1.5 10g/L

pH-Wert mit NaOH auf 6,0 einstellen und autoklavieren

Kulturbedingungen:

Temperatur (°C): 28

Schüttelrate (rpm): 150

Die Zellernte erfolgte nach 144,5h Kultivierung durch Zentrifugation. Anschließend wurden die Zellen gefriergetrocknet und die Biotrockenmasse bestimmt. Aufschluß der Zellen und Bestimmung der Fettsäuren erfolgte durch Hitzebehandlung für 2 Stunden in 10%iger methanolischer Salzsäure bei 60°C (unter Rühren). Die Ester wurden dann im Gaschromatographen zur Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung analysiert.

Tabelle 2: Fermentationsparameter nach Glukoselimitierung

	CaCO ₃ (g/L)	Glukose- verbrauch (g/L)	pH- Wert	BTM (g/L)	DHA- Area (%)	DHA/BTM (%)	DHA (g/L)	DHA-RZA (g/Lxd)
Medium 1.4	5	150,0	6,49	58,52	47,7	22,20	12,99	2,14
Medium 1.5	10	150,0	6,58	64,65	46,7	20,54	13,28	2,19

Die Fermentation von *Ulkenia* spec SAM 2179 in mit 5g/L bzw. 10g/L CaCO₃ gepufferten Medium ermöglicht eine Kultivierung bis zur Glukoselimitierung, ohne starkes Absinken des pH-Wertes. Die dabei erreichbare Biomasse und der Anteil von DHA pro Biomasse sind, mit etwa 58-64g/L Biomasse und 20-22% DHA/BTM, entsprechend dem vollständigen Glukoseverbrauch sehr hoch. Hierbei zeigt sich, dass die höhere CaCO₃-Konzentration (10g/L) zu einer größeren Biomasse führt, der Anteil der essentiellen PUFA DHA pro Biomasse gegenüber der niedrigeren Konzentration CaCO₃ (5g/L) jedoch etwas abnimmt. Die dabei erzielte Raum-Zeit-Ausbeute an DHA bleibt allerdings bei beiden Konzentrationen etwa gleich.

Beispiel 3: Kultivierung von *Ulkenia* spec. Stamm SAM 2179, zur Produktion von PUFA, unter optimierten Fermentationsbedingungen.

Ulkenia spec Stamm SAM 2179 wurde in 300ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane in 50mL Medium bis zum vollständigen Glukoseverbrauch kultiviert. Die Optimierung der Fermentation resultierte aus einer CaCO₃-Konzentration von 7,5g/L und einer veränderten Vorkultur. Für die Vorkultur wurde anstelle einer Standkultur in DH1-Medium eine Schüttelkultur mit gleichem Medium verwendet (48h, 150rpm und 28°C).

Medienzusammensetzung:

Vorkulturmedium: DH1-Medium

Glukose-Monohydrat (g/l): 56,25

Hefeextrakt (g/l): 12,5 [Difco]

Tropic Marin (g/l): 16,65 [Dr. Biener GmbH, Wartenberg, Germany]

pH-Wert mit HCl auf 6,0 eingestellt

Fermentationsmedium:

Glucose 150g/L

Maisquell
-wasser 3,75g/L

KH₂PO₄ 3g/L

Na₂SO₄ 1g/L

MgCl₂·6H₂O 1g/L

CaCl₂·2H₂O 0,3g/L

(NH₄)₂SO₄ 5g/L

Zusatz CaCO₃ je 50mL Kolben: Medium 1.6 7,5g/L

pH-Wert mit NaOH auf 6,0 einstellen und autoklavieren

Kulturbedingungen:

Temperatur (°C): 28

Schüttelrate (rpm): 150

Die Zellernte erfolgte nach 99,75h Kultivierung durch Zentrifugation. Anschließend wurden die Zellen gefriergetrocknet und die Biotrockenmasse bestimmt. Aufschluß der Zellen und Bestimmung der Fettsäuren erfolgte durch Hitzebehandlung für 2 Stunden in 10%iger methanolischer Salzsäure bei 60°C (unter Rühren). Die Ester wurden dann im Gaschromatographen zur Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung analysiert.

Tabelle 3: Fermentationsparameter unter optimierten Pufferbedingungen

	CaCO ₃	Glukose- verbrauch	pH- Wert	BTM	DHA- Area	DHA/BTM	DHA	DHA-RZA
	(g/L)	(g/L)		(g/L)	(%)	(%)	(g/L)	(g/Lxd)
Medium 1.6	7,5	150,0	6,76	63,84	44,1	23,06	14,72	3,54

Durch den Einsatz optimierter Fermentationsbedingungen, bei denen *Ulkenia spec.* SAM 2179 zunächst 48h bei 28°C und 150rpm in DH1-Medium kultiviert wurde, konnte die DHA-Raum-Zeit-Ausbeute auf mehr als 3,5g/Lxd erheblich verbessert werden. Dies resultiert in erster Linie aus einem schnelleren Wachstum, wobei die Glukoselimitierung in weniger als 100h erreicht wurde. Der Einsatz von 7,5g/L CaCO₃ im Fermentationsmedium ermöglicht eine für die optimierte Kultivierung notwendige pH-Stabilisierung. Der Einsatz von 7,5g/L CaCO₃ ergab sich aus den Ergebnissen von Beispiel 2, bei denen 10g/L CaCO₃ höhere Biomassewerte ergaben, 5g/L CaCO₃ hingegen zu besseren DHA-Werten führten. Somit wurde eine für die Produktion von DHA optimale CaCO₃-Konzentration (d.h. möglichst hohe Biomasse bei möglichst hohem DHA-Gehalt) zwischen 5 und 10g/L CaCO₃ vermutet. Neben der Stabilisierung des pH-Wertes führt der Einsatz des erfindungsgemäßen Fermentationsmediums zu einer überraschend hohen DHA Raum-Zeit-Ausbeute von über 3g/Lxd zum Zeitpunkt der Glukoselimitierung. Hierbei wurden ähnliche Biomassewerte wie in Beispiel 2 erreicht, darüber hinaus waren aber der Anteil an DHA pro Biotrockenmasse und die erzielten DHA-Mengen (mehr als 10%) größer.

Beispiel 4: Fermentation von *Ulkenia spec.* Stamm SAM 2179 zur Produktion von PUFA in Kulturmedium mit und ohne pH-Stabilisierung durch CaCO₃.

Ulkenia spec. Stamm SAM 2179 wurde jeweils in einem 5L-Fermenter bis zum vollständigen Glukoseverbrauch kultiviert.

Medienzusammensetzung:

Fermentationsmedium:

Glucose 150g/L

Maisquell -wasser	3,75g/L
KH_2PO_4	3g/L
Na_2SO_4	1g/L
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	1g/L
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,3g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5g/L

Für die Fermentation mit pH Steuerung: pH-Wert mit H_3PO_4 auf 4,0 einstellen und autoklavieren

Für die Fermentation ohne pH-Steuerung: pH-Wert mit NaOH auf 6,0 einstellen und autoklavieren sowie Zusatz von 7,5g/L CaCO_3

Kulturbedingungen:

Temperatur (°C): 28

Belüftung: 0,8vvm

Fermentation mit und ohne pH-Steuerung

Tabelle 4: Fermentationsparameter mit und ohne pH-Steuerung

pH- Steuerung	CaCO_3 (g/L)	Glukose- verbrauch (g/L)	Zeitpunkt Glukose- verbrauch (h)	BTM (g/L)	DHA- Area (%)	DHA/BTM (%)	DHA (g/L)	DHA-RZA (g/L x d)
+	0	150,0	162	66,9	47,2	25,9	17,35	2,5
-	7,5	150,0	150	67,8	46,7	26,9	18,30	2,9

Der Einsatz des erfindungsgemäßen, durch CaCO_3 –stabilisierenden, Fermentationsmediums ermöglicht auch im 5L-Fermentationsmaßstab eine Kultivierung von *Ulkenia spec SAM 2179* bis zur Glukoselimitierung, ohne pH-Steuerung. Der Einsatz von CaCO_3 in ausreichender

Menge führt zu einem schnelleren Wachstum als Folge eines beschleunigten Glukoseverbrauchs. Darüber hinaus werden höhere Biomassen erzielt. Weiterhin werden in diesem Zusammenhang während der Fermentation ein erhöhter DHA-Anteil pro Biomasse und größere Mengen DHA erzielt. Dies führt zu einer nicht unerheblichen Steigerung der DHA-Raum-Zeit-Ausbeute bei CaCO_3 -gepuffert gegenüber pH-gesteuerter Fermentation von mehr als 15%.

Beispiel 5: Fermentation von *Schizochytrium spec.* SR21 zur Produktion von PUFA in Fermentationsmedium 1.6 stabilisiert durch 7,5g/L CaCO_3

Schizochytrium spec. Stamm SR21 wurde in 300ml Erlenmeyerkolben mit einer Schikane in 50mL Medium bis zum vollständigen Glukoseverbrauch kultiviert.

Medienzusammensetzung:

Vorkulturmedium: GY-Medium

Glukose (g/l): 30,0

Hefeextrakt (g/l): 10,0 [Difco]

Tropic Marin (g/l): 16,65 [Dr.Biener GmbH, Wartenberg, Germany]

pH-Wert mit HCl auf 6,0 eingestellt

Fermentationsmedium:

Glucose	150g/L
Maisquell -wasser	3,75g/L
KH_2PO_4	3g/L
Na_2SO_4	1g/L
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	1g/L
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,3g/L

(NH₄)₂SO₄ 5g/LZusatz CaCO₃ je 50mL Kolben: Medium 1.6 7,5g/L

pH-Wert mit NaOH auf 6,0 einstellen und autoklavieren

Kulturbedingungen:

Temperatur (°C): 28

Schüttelrate (rpm): 150

Die Zellernte erfolgte nach 96h Kultivierung durch Zentrifugation. Anschließend wurden die Zellen gefriergetrocknet und die Biotrockenmasse bestimmt. Aufschluß der Zellen und Bestimmung der Fettsäuren erfolgte durch Hitzebehandlung für 2 Stunden in 10%iger methanolischer Salzsäure bei 60°C (unter Rühren). Die Ester wurden dann im Gaschromatographen zur Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung analysiert.

Tabelle 5: Fermentationsparameter unter optimierten Pufferbedingungen

	CaCO ₃	Glukose- verbrauch	pH- Wert	BTM	DHA- Area	DHA/BTM	DHA	DHA-RZA
	(g/L)	(g/L)		(g/L)	(%)	(%)	(g/L)	(g/L x d)
SR 21	7,5	150,0	7,35	66,12	34,4	15,28	10,10	2,52

Das in der Erfindung beschriebene durch CaCO₃ pH-stabilisierte Medium führt auch bei anderen Organismen der *Labyrinthulomycota* zu einer Optimierung der Produktion von PUFA. So kann beispielsweise der Mikroorganismus *Schizochytrium spec.* Stamm SR21 in dem der Erfindung zugrunde liegenden Medium fermentiert werden. Die Raum-Zeit-Ausbeute der essentiellen PUFA, DHA in SR 21 ist etwas niedriger als in *Ulkenia sp. SAM 2179* (siehe Beispiel 3), liegt aber bezogen auf die essentielle n-3 PUFA DHA über 15% (w/w) der gesamten Biotrockenmasse. Dieses Beispiel zeigt, dass das der Erfindung zugrunde liegende optimierte pH-stabilisierte Medium eine Fermentation ohne pH-Steuerung zur Produktion von PUFAs auch in weiteren Mitgliedern der *Labyrinthulomycota* ermöglicht.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Kultivierung von Mikroorganismen der Gattung *Thraustochytriales*, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikroorganismen in einem Fermentationsmedium mit höchstens geringfügigem Zusatz anderer pH-Wert stabilisierender Mittel außer CaCO_3 kultiviert werden, bevorzugt ohne Zusatz anderer pH-Wert stabilisierender Mittel außer CaCO_3 .
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Mikroorganismen eine Produktion von mehr als 25, bevorzugt von mehr als 35 und ganz besonders bevorzugt von mehr als 45 Gew.-% Öl pro Gewichtseinheit Biotrockenmasse hervorbringen.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Mikroorganismen eine Produktion von mehr als 10, bevorzugt von mehr als 14, besonders bevorzugt von mehr als 18, und ganz besonders bevorzugt von mehr als 22 Gew.-% DHA pro Gewichtseinheit Biotrockenmasse hervorbringen.
4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Mikroorganismen eine Produktion von mehr als 1%, bevorzugt mehr als 2%, besonders bevorzugt mehr als 3% und ganz besonders bevorzugt von mehr als 4% DPA pro Biotrockenmasse hervorbringen.
5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei dem Medium 3g/L bis 15g/L, bevorzugt 4g/L bis 12 g/L, besonders bevorzugt 5g/L bis 10g/L und ganz besonders bevorzugt $7,5 \pm 0,5$ g/L CaCO_3 zugesetzt werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, dass das Medium Glukose, Maisquellwasser, Magnesiumchlorid, Calciumchlorid, Calciumcarbonat, Natriumsulfat, Ammoniumsulfat und Kaliumhydrogenphosphat umfasst.

7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Medium einen pH-Wert zwischen 3 und 10, bevorzugt zwischen 5 und 7 aufweist.
8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Kultivierung zwischen 10°C und 40°C erfolgt, bevorzugt zwischen 25°C und 35°C.
9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Kultivierung für 1 bis 10 Tage erfolgt, bevorzugt für 3 bis 9 Tage.
10. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus zur Gattung *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* oder *Ulkenia* gehört.
11. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus *Ulkenia spec.* SAM 2179 ist.
12. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Mikroorganismus *Schizochytrium spec.* SR 21 ist.
13. Verwendung eines Kulturmediums umfassend ausschließlich CaCO₃ als pH-Stabilisierungsmittel zur Kultivierung von Mikroorganismen der Ordnung *Thraustochytriales*.
14. Öl mit einem Gehalt von mindestens 20 Area(%) DHA, bevorzugt mindestens 30 Area(%) DHA und besonders bevorzugt mindestens 40 Area(%) DHA, hergestellt unter Anwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und nachfolgender Isolierung des Öls aus der Kulturbrühe und/oder der darin befindlichen Biomasse.
15. Öl mit einem Gehalt von mindestens 3% Area(%) DPA, bevorzugt mindestens 6 Area(%) DPA und besonders bevorzugt 9 Area(%) DPA, hergestellt unter Anwendung eines

Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und nachfolgender Isolierung des Öls aus der Kulturbrühe und/oder der darin befindlichen Biomasse.

16. DHA mit mindestens 90%iger Reinheit, hergestellt unter Anwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und nachfolgender Isolierung der DHA aus der Kulturbrühe und/oder der darin befindlichen Biomasse.

17. DPA mit mindestens 90%iger Reinheit, hergestellt unter Anwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und nachfolgender Isolierung der DPA aus der Kulturbrühe und/oder der darin befindlichen Biomasse.

18. Biomasse erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und nachfolgender Trennung der Biomasse aus der Kulturbrühe.

19. Futtermittel umfassend Biomasse nach Anspruch 18.

20. Nahrungsmittel für die menschliche Ernährung umfassend Biomasse nach Anspruch 18.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/012715

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P7/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BAJPAI P K ET AL: "Optimization of production of docosahexaenoic acid (DHA) by <i>Thraustochytrium aureum</i> ATCC 34304" JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. CHAMPAIGN, US, vol. 68, no. 7, July 1991 (1991-07), pages 509-514, XP008023474 ISSN: 0003-021X	1,2, 7-10, 14-20
Y	Zusammenfassung, Material und Methoden, Ergebnisse, Diskussion; -----	1-20
X	WO 98/03671 A (NAGASE BIOCHEMICALS, LTD; SUNTORY LIMITED; TANAKA, SATOHIRO; YAGUCHI,) 29 January 1998 (1998-01-29)	14-20
Y	claims; examples 1, 2 ----- -/--	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 February 2005

Date of mailing of the international search report

11/03/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sommer, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/012715

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 823 475 A (NAGASE BIOCHEMICALS, LTD; JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR-GENERAL; SU) 11 February 1998 (1998-02-11)	14-20
Y	-----	1-20
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 013, no. 589 (C-670), 25 December 1989 (1989-12-25) & JP 01 247079 A (NEC CORP), 2 October 1989 (1989-10-02) abstract	1-13
Y	----- PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1996, no. 12, 26 December 1996 (1996-12-26) & JP 08 196288 A (KAIYO BIO TECHNOL KENKYUSHO:KK), 6 August 1996 (1996-08-06) abstract	1-13
Y	----- EP 0 113 183 A (CARSON, THOMAS ANTHONY) 11 July 1984 (1984-07-11) claims -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2004/012715**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1-13, 18-20

Method for cultivating micro-organisms of the genus *Thraustochytriales*, characterised in that the micro-organisms are cultivated in a fermentation medium with at most a small addition of substances other than CaCO₃ for stabilising the pH level, and related subject matter.

2. Claim 14

Oil containing at least 20 area percent DHA, and related subject matter.

3. Claim 15

Oil containing at least 3 area percent DPA, and related subject matter.

4. Claim 16

DHA with at least 90 percent purity, and related subject matter.

5. Claim 17

DPA with at least 90 percent purity, and related subject matter.

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9803671	A	29-01-1998	AU 723553 B2	31-08-2000
			AU 2979897 A	10-02-1998
			BR 9710394 A	11-01-2000
			CA 2261231 A1	29-01-1998
			CZ 9900199 A3	14-07-1999
			EE 9900026 A	16-08-1999
			EP 0935667 A1	18-08-1999
			HU 9903703 A2	28-03-2000
			ID 17466 A	08-01-1998
			WO 9803671 A1	29-01-1998
			JP 3343358 B2	11-11-2002
			JP 2000513575 T	17-10-2000
			JP 3538418 B2	14-06-2004
			JP 2002345452 A	03-12-2002
			LT 99005 A , B	25-06-1999
			LV 12329 A , B	20-08-1999
			NO 990270 A	18-03-1999
			PL 331326 A1	05-07-1999
			RU 2226216 C2	27-03-2004
			TR 9900130 T2	21-04-1999
			US 6509178 B1	21-01-2003
			US 2003161864 A1	28-08-2003
EP 0823475	A	11-02-1998	AU 5346296 A	07-11-1996
			EP 0823475 A1	11-02-1998
			US 6582941 B1	24-06-2003
			WO 9633263 A1	24-10-1996
			JP 2764572 B2	11-06-1998
			JP 9000284 A	07-01-1997
			JP 10072590 A	17-03-1998
JP 01247079	A	02-10-1989	NONE	
JP 08196288	A	06-08-1996	NONE	
EP 0113183	A	11-07-1984	AU 2048883 A	03-05-1984
			AU 2186583 A	07-06-1984
			DK 478583 A	23-04-1984
			DK 547683 A	02-06-1984
			EP 0110527 A1	13-06-1984
			EP 0113183 A1	11-07-1984
			GB 2133804 A	01-08-1984
			GB 2134924 A	22-08-1984
			JP 59205990 A	21-11-1984
			ZA 8308867 A	25-07-1984

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12P7/64

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12P

Rechercherte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EP0-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BAJPAI P K ET AL: "Optimization of production of docosaehaenoic acid (DHA) by Thraustochytrium aureum ATCC 34304" JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY, AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. CHAMPAIGN, US, Bd. 68, Nr. 7, Juli 1991 (1991-07), Seiten 509-514, XP008023474 ISSN: 0003-021X	1,2, 7-10, 14-20
Y	Zusammenfassung, Material und Methoden, Ergebnisse, Diskussion;	1-20
X	WO 98/03671 A (NAGASE BIOCHEMICALS, LTD; SUNTORY LIMITED; TANAKA, SATOHIRO; YAGUCHI,) 29. Januar 1998 (1998-01-29)	14-20
Y	Ansprüche; Beispiele 1,2	1-20
	----- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. Februar 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11/03/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Sommer, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 823 475 A (NAGASE BIOCHEMICALS, LTD; JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR-GENERAL; SU) 11. Februar 1998 (1998-02-11)	14-20
Y	-----	1-20
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Bd. 013, Nr. 589 (C-670), 25. Dezember 1989 (1989-12-25) & JP 01 247079 A (NEC CORP), 2. Oktober 1989 (1989-10-02) Zusammenfassung	1-13
Y	----- PATENT ABSTRACTS OF JAPAN Bd. 1996, Nr. 12, 26. Dezember 1996 (1996-12-26) & JP 08 196288 A (KAIYO BIO TECHNOL KENKYUSHO:KK), 6. August 1996 (1996-08-06) Zusammenfassung	1-13
Y	----- EP 0 113 183 A (CARSON, THOMAS ANTHONY) 11. Juli 1984 (1984-07-11) Ansprüche	1-13

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/012715

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☒ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-13, 18-20

Verfahren zur Kultivierung von Mikroorganismen der Gattung Thraustochytriales, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikroorganismen in einem Fermentationsmedium mit höchstens geringfügigem Zusatz anderer pH-Wert stabilisierender Mittel ausser CaCO₃ kultiviert werden, sowie dazugehörende Gegenstände;

2. Anspruch: 14

Öl mit einem Gehalt von mindestens 20 Area(%) DHA, sowie dazugehörende Gegenstände;

3. Anspruch: 15

Öl mit einem Gehalt von mindestens 3 Area(%) DPA, sowie dazugehörende Gegenstände;

4. Anspruch: 16

DHA mit mindestens 90%iger Reinheit sowie dazugehörende Gegenstände;

5. Anspruch: 17

DPA mit mindestens 90%iger Reinheit sowie dazugehörende Gegenstände;

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9803671	A	29-01-1998	AU	723553 B2	31-08-2000
			AU	2979897 A	10-02-1998
			BR	9710394 A	11-01-2000
			CA	2261231 A1	29-01-1998
			CZ	9900199 A3	14-07-1999
			EE	9900026 A	16-08-1999
			EP	0935667 A1	18-08-1999
			HU	9903703 A2	28-03-2000
			ID	17466 A	08-01-1998
			WO	9803671 A1	29-01-1998
			JP	3343358 B2	11-11-2002
			JP	2000513575 T	17-10-2000
			JP	3538418 B2	14-06-2004
			JP	2002345452 A	03-12-2002
			LT	99005 A , B	25-06-1999
			LV	12329 A , B	20-08-1999
			NO	990270 A	18-03-1999
			PL	331326 A1	05-07-1999
			RU	2226216 C2	27-03-2004
			TR	9900130 T2	21-04-1999
			US	6509178 B1	21-01-2003
			US	2003161864 A1	28-08-2003
EP 0823475	A	11-02-1998	AU	5346296 A	07-11-1996
			EP	0823475 A1	11-02-1998
			US	6582941 B1	24-06-2003
			WO	9633263 A1	24-10-1996
			JP	2764572 B2	11-06-1998
			JP	9000284 A	07-01-1997
			JP	10072590 A	17-03-1998
JP 01247079	A	02-10-1989	KEINE		
JP 08196288	A	06-08-1996	KEINE		
EP 0113183	A	11-07-1984	AU	2048883 A	03-05-1984
			AU	2186583 A	07-06-1984
			DK	478583 A	23-04-1984
			DK	547683 A	02-06-1984
			EP	0110527 A1	13-06-1984
			EP	0113183 A1	11-07-1984
			GB	2133804 A	01-08-1984
			GB	2134924 A	22-08-1984
			JP	59205990 A	21-11-1984
			ZA	8308867 A	25-07-1984